

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-178472

(P2001-178472A)

(43) 公開日 平成13年7月3日(2001.7.3)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト <sup>*</sup> (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		1/34	Z 4 B 0 2 9
1/34		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53		33/566	Z N A
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 11 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平11-371074

(22) 出願日 平成11年12月27日(1999.12.27)

(71) 出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社

神奈川県南足柄市中沼210番地

(72) 発明者 稲垣 由夫

神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真

フイルム株式会社内

(72) 発明者 篠木 浩

埼玉県朝霞市泉水3-11-46 富士写真フ

イルム株式会社内

(74) 代理人 100074675

弁理士 柳川 泰男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固相担体表面へのDNA断片の固定方法及びDNAチップ

(57) 【要約】

【課題】 固相担体表面に、DNA断片を迅速な反応によって結合させることが可能で、かつ、反応生成物が安定に結合を維持することが可能な固定方法を開発し、ブロッキング工程が不要なDNAチップを得ること。

【解決手段】 光照射により活性を示す化合物が表面に結合している固相担体に、DNA断片を液相にて接触させながら光照射を行なうことにより該化合物とDNA断片との間に共有結合を形成することを特徴とするDNA断片の固相担体への固定方法、この方法により得られたDNAチップ、そしてそのDNAチップを用いるDNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片を検出する方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 光照射により活性を示す化合物が表面に結合している固相担体に、DNA断片を液相にて接触させながら光照射を行なうことにより該化合物とDNA断片との間に共有結合を形成することを特徴とするDNA断片の固相担体への固定方法。

【請求項2】 光照射により活性を示す化合物が、ナイトレン、カルベン、ラジカル、炭素求電子剤、ジアゾニウム基、アジド基、ジアジリン環、もしくはジアゾ基を有する化合物であることを特徴とする請求項1に記載のDNA断片の固相担体への固定方法。

【請求項3】 請求項1もしくは2に記載の方法によって得られたDNAチップ。

【請求項4】 請求項3に記載のDNAチップの表面に、蛍光物質もしくは放射性物質で標識した核酸断片試料を含む水性液を付与する工程、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する核酸断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定する工程、そしてDNAチップ上に固定された標識核酸断片試料の蛍光標識もしくは放射性標識を検出する工程からなる、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法。

【請求項5】 請求項3に記載のDNAチップの表面に、蛍光発生基もしくは導電性基を有するインターカレータと核酸断片試料とを含む水性液を付与する工程、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する核酸断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定する工程、そしてDNAチップのDNA断片と核酸断片試料とから形成されたハイブリッド構造内に取り込まれたインターカレータの蛍光発生基から発生する蛍光もしくは導電性基を介して流れる電流を検出する工程からなる、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、遺伝子の発現、変異、多型等の同時解析に非常に有用である、多数のDNA断片やオリゴヌクレオチドを固相表面に整列させた高密度アレイ（DNAチップ）の作製に必要な、DNA断片の固相担体表面への固定方法に関する。本発明はまた、そのDNA断片の固相担体表面への固定方法により製造されたDNAチップ、そしてDNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法にも関する。

## 【0002】

【従来の技術】 多彩な生物の全遺伝子機能を効率的に解析するための技術開発が進んでおり、その解析手段として、DNAチップが利用されている。DNAチップは通常、スライドガラス等の固相担体に多数のDNA断片を整列固定させたマイクロアレイの形態にあり、DNAチ

ップに固定されているDNA断片と相補性を持つDNA断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定し、検出する方法に利用される。形成されたハイブリッドの検出手段としては、DNA断片試料に予め結合させた蛍光標識あるいは放射性標識を利用する方法、そしてハイブリッドに取り込まれる蛍光発生基もしくは導電性基を持つインターカレータを利用する方法などが知られている。

【0003】 DNAチップを用いるDNAチップ技術は、DNA以外の生体分子にも適用可能であり、創薬研究、疾病の診断や予防法の開発、エネルギーや環境問題対策等の研究開発に新しい手段を提供するものとして期待されている。

【0004】 DNAの解析手段としてのDNAチップの利用が具体化してきたのは、DNAの塩基配列をオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって決定する方法（SBH, sequencing by hybridization）が考案されたことに始まる（Dermanac, R. et al., Genomics, 4, page 114 (1989)）。SBHは、ゲル電気泳動を用いる塩基配列決定法の限界を克服できる方法ではあったが、実用化には至らなかった。

【0005】 その後、DNAチップ作製技術が開発され、遺伝子の発現、変異、多型等を短時間で効率よく調べる、いわゆるHTS (high throughput screening) が可能となった（Fodor, S. P. A., Science, 251, page 767 (1991) および Schena, M., Science, 270, page 467 (1995)）。

【0006】 しかし、DNAチップ利用技術を実用化するためには、多数のDNA断片やオリゴヌクレオチドを固相担体表面に整列固定させるためのDNAチップの作製技術が必要とされる。

【0007】 DNAチップの作製方法としては、固相担体表面で直接DNA断片を合成する方法（「オン・チップ法」という。）と、予め別に調製したDNA断片を固相担体表面に固定する方法とが知られている。オン・チップ法としては、光照射で選択的に除去される保護基の使用と、半導体製造に利用されるフォトリソグラフィ技術および固相合成技術とを組み合わせ、微小なマトリックスの所定の領域での選択的合成を行う方法（「マスキング技術」という。）が代表的である。

【0008】 予め調製したDNA断片を固相担体表面に固定する方法としては、DNA断片の種類や固相担体の種類に応じて下記の方法がある。

(1) 固定するDNA断片がcDNA (mRNAを鋳型にして合成した相補的DNA) やPCR産物 (cDNAをPCR法によって増幅させたDNA断片) の場合には、これらをDNAチップ作製装置に備えられたスポッ

タ装置を用いて、ポリ陽イオン（ポリリシン、ポリエチレンイミン等）で表面処理した固相担体表面に点着して、DNAの荷電を利用して固相担体に静電結合させる方法が一般的に利用される。また、固相担体表面の処理方法として、アミノ基、アルデヒド基、エポキシ基等を有するシランカップリング剤を用いる方法も利用されている（Geo, Z. et al., *Nucleic Acid Research*, 22, 5456-5465 (1994)）。この場合には、アミノ基、アルデヒド基等は、共有結合により固相担体表面に導入されるため、ポリ陽イオンによる場合と比較して安定に固相担体表面に存在する。

【0009】DNAの荷電を利用する方法の変法として、アミノ基で修飾したPCR産物をSSC（標準食塩クエン酸緩衝液）に懸濁させ、これをシリル化したスライドガラス表面に点着し、インキュベートした後、水素化ホウ素ナトリウムによる処理および加熱処理を順に行う方法が報告されている（Schena, M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10614-10619 (1996)）。しかし、この固定方法では必ずしも十分な安定度が得られ難いという問題がある。DNAチップ技術では、検出限界が重要となる。そのため、固相担体表面に十分な量で安定にDNA断片を固定する技術の開発は、固定DNA断片と標識した試料核酸断片とのハイブリダイゼーションの検出限界の向上に大きく寄与する。

【0010】（2）固定するDNA断片が合成オリゴヌクレオチドの場合には、反応活性基を導入したオリゴヌクレオチドを合成し、表面処理した固相担体表面に該オリゴヌクレオチドを点着し、共有結合させる（「蛋白質・核酸・酵素」、43巻、（1998）、2004-2011、Lamtire, J. B. et al., *Nucl. Acids Res.*, 22, 2121-2125, 1994、およびGuo, Z., et al., *Nucl. Acids Res.*, 22, 5456-5465, 1994）。例えば、アミノ基を導入したスライドガラスに、PDC（p-フェニレンジイソチオシアネート）存在下、アミノ基導入オリゴヌクレオチドを反応させる方法、および該スライドガラスに、アルデヒド基導入オリゴヌクレオチドを反応させる方法が知られている。これらの二つの方法は、前記（1）のDNAの荷電を利用する方法と比べて、オリゴヌクレオチドが固相担体表面に安定に固定される。しかし、PDCを存在させる方法は、PDCとアミノ基導入オリゴヌクレオチドとの反応が遅く、またアルデヒド基導入オリゴヌクレオチドを用いる方法は、反応生成物であるシッフ塩基の安定性が低い（通常、加水分解が起こり易い）という問題点を有し、さらに、固相表面にアミノ基のようにDNAとの相互作用の強い官能基が全面に存在すると、被検体である核酸断片がDNAチップ全面に非特異的に付着し

やすいため、検出を妨害するという問題がある。このため、これを防止するために、未反応の官能基を塞ぐ、ブロッキングという工程が必要であった。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、固相担体表面に、予め別に調製したDNA断片を迅速な反応によって結合させることが可能で、かつ、反応生成物が安定に結合を維持することが可能な固定方法、ブロッキング工程を特に必要としないDNAチップ、および核酸断片の検出方法を提供することを、その課題とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】上記の課題は下記の本発明によって解決された。

【0013】（1）光照射により活性を示す化合物が表面に結合している固相担体に、DNA断片を液相にて接触させながら光照射を行なうことにより該化合物とDNA断片との間に共有結合を形成することを特徴とするDNA断片の固相担体への固定方法。本発明の固定方法において、光照射により活性を示す化合物が、ナイトレン、カルベン、ラジカル、炭素求電子剤、ジアゾニウム基、アジド基、ジアジリン環、もしくはジアゾ基を有する化合物であることが好ましい。

（2）上記の方法によって得られたDNAチップ。

【0014】（3）上記のDNAチップの表面に、蛍光物質もしくは放射性物質で標識した核酸断片試料を含む水性液を付与する工程、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する核酸断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定する工程、そしてDNAチップ上に固定された標識核酸断片試料の蛍光標識もしくは放射性標識を検出する工程からなる、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法。

（4）上記のDNAチップの表面に、蛍光発生基もしくは導電性基を有するインターカレータと核酸断片試料を含む水性液を付与する工程、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する核酸断片試料をハイブリダイゼーションによってDNAチップ上に固定する工程、そしてDNAチップのDNA断片と核酸断片試料とから形成されたハイブリッド構造内に取り込まれたインターカレータの蛍光発生基から発生する蛍光もしくは導電性基を介して流れる電流を検出する工程からなる、DNAチップ上のDNA断片に対して相補性を有する核酸断片の検出方法。

【0015】本発明のDNA断片の固相担体表面への固定方法の好ましい態様は、以下の通りである。

（1）光照射によりDNAとの間に共有結合を形成し得る活性種を発生する化合物が固定されているDNA断片固定用固相担体の表面にDNAを付着させた後に光を照射してDNAとの間に共有結合を形成し得る活性種を発生させることによりDNA断片を固相担体表面へ固定す

る。

(2) DNA断片として、その塩基配列が既知であるものをを用いる。

(3) 本発明のDNA断片固定用固相担体に、蛍光物質で標識した核酸断片試料を溶解あるいは分散してなる水性液を点着した後、インキュベートして、該DNA断片固定用固相担体に固定されているDNA断片と核酸断片試料とで形成されたハイブリッドDNAを検出することにより、該DNA断片固定用固相担体に固定されているDNA断片に対して相補性を有する核酸断片を検出する。

#### 【0016】

【発明の実施の形態】本発明のDNA断片固定用固相担体は、固相担体と、その上に担持された光反応性化合物とからなり、これにDNAを固定してDNA固定固相担体とする。

【0017】添付図面の第1図に本発明のDNA断片の固相担体への固定方法の実施の形態の概略を示す。

【0018】本発明のDNA断片固定固相担体（以下「DNAチップ」という。）の作成において、照射によりDNA断片固定用固相担体の表面に固定されている化合物から発生する、DNAとの間に共有結合を形成し得る活性種としては、ナイトレン、カルベン、ラジカル、イオンラジカル、ジラジカル、励起三重項、カルボカチオン等の炭素求電子試薬などが挙げられる。

【0019】照射によりこれらの活性種を発生する化合物の構造的特徴は、以下に述べるとおりであり、いわゆる光アフィニティラベルの光反応基として用いられる基を有する化合物が好ましい。光アフィニティラベルに用いられる試薬の例は、例えば1995年発行のテトラヘドロン誌（Tetrahedron）第51巻、12479乃至12520ページのS. A. Flemigの著した総説、および1998年発行の有機合成協会誌、第56巻581乃至590ページの畑中保丸の著した総説に記載されている。すなわち、ナイトレンを発生する化合物としては、芳香族アジド、アルキルアジド、ヘテロ環アジドなどのアジド基を有する化合物であり、カルベンを発生する化合物としてはジアゾ基またはジアジリン環を有する化合物であり、ラジカルを発生する化合物としてはベンゾフェノン類やエノン類のような共役ケトン類、芳香族ハロゲン化物類、オレフィン類などであり、炭素求核試薬を発生する化合物としては芳香族ジアゾニウム塩、ニトロベンゼン類、スルホニウム塩、ホスホニウム塩、アンモニウム塩などである。これらの光反応性化合物はそれぞれ特徴があるので、使用条件に応じて選択して用いることができるが、安定性が比較的高い点と核酸塩基の光反応を起こしにくい比較長波長の光で活性化できる点では、ジアジリン環を有する化合物が好ましい。

【0020】安定性と合成の容易さの点では、共役ケト

ン類、芳香族ハロゲン化物類、オレフィン類などが好ましい。陰イオン性の核酸との親和性が高い点ではジアゾニウム塩などの陽イオン性の化合物が好ましい。

【0021】これらの活性種を発生する化合物は、固相担体に直接共有結合で連結することが連結操作の簡便性の点では好ましいが、固相担体にあらかじめ共有結合で連結された化合物に共有結合させることにより連結してもよい。または、固相担体表面に予め担持されたポリ陽イオンポリマーとの静電的相互作用を利用して担持することも可能である。または、固相担体表面に、これらの活性種を発生する化合物の前駆体を固定した後、適当な反応処理を施すことにより活性種を発生する化合物に導くこともできる。

【0022】これらの化合物を共有結合を介して固相担体の表面に連結するには、公知の合成反応が利用できる。反応の例としてはガラス表面とシランカップリング剤との反応、合成樹脂表面の官能基と活性ハロゲン化物との反応、セルロース系樹脂とイソシアネート類との反応などが挙げられる。

【0023】予め固相担体の表面に導入された基との反応の例としては、求核性基（アミノ基、ヒドロキシ基など）と電子受容基（カルボキシル基、エステル基、イソシアネート基、イソチオシアネート基、共役ケトン、アクリル酸エステル、ビニルスルホン、酸無水物、アシルハライド、スルホニルハライドなど）との組み合わせが挙げられる。

【0024】本発明で固相担体表面に光反応性基を導入する際に用いられる、光反応性基を有する化合物のうち、下記一般式（I）で表される化合物が好ましい。

#### 【0025】

##### 【化1】（I）

G-A-L

【0026】上記式中、Gは、アジド基（ $N=N=N$ ）、ジアゾ基（ $C(R^1)=N=N$ ）、ジアジリニル基（ $C(*) (R^1) N=N*$ 、式中、\*同士は連結して三員環を形成することを表す。）、ジアゾニウム基（ $N_2^+ X^-$ ）を表し； $R^1$ は、アシル基、アルキルもしくはアリールスルホニル基、アルキル基、アリール基を表し； $R^2$ は、水素原子、アルキル基、アリール基を表し；Aは、アリーレン基を表し；Lは固相担体表面に担持された官能基と反応して共有結合を形成しうる基を表す。

【0027】一般式（I）で表される化合物において、 $R_1$ で表される基は、好ましくは炭素原子数が2乃至10のアシル基または炭素原子数が6乃至12のアリール基であり、これらの基は電子吸引基で置換されていることが特に好ましい。 $R_2$ で表される基は好ましくは炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至12の置換基を有していてもよいフェニル基であり、特に好ましくはフッ素原子などの電子吸引基で置換されたア

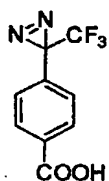
ルキル基である。Aで表されるアリーレン基は、GとL以外の置換基を有していてもよいフェニレン基であることが好ましく、p-フェニレン基が特に好ましい。Lで表される基として好ましいものは、カルボキシル基、ホルミル基、活性エステル基、ヒドロキシ基、アミノ基、ハロゲン置換アルキル基、トリアルコキシシリル基、およびこれらの置換基を有する基である。

\* 【0028】以下に、本発明で固相担体表面に光反応性基を導入する際に用いられる、光反応性基を有する化合物あるいはその前駆体の具体例を挙げるが、本発明の範囲はこれらのみにて限定されるものではない。

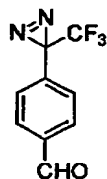
【0029】

【化2】

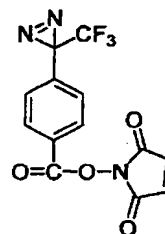
(D1)



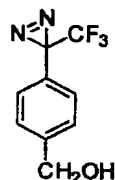
(D2)



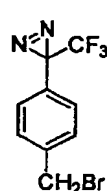
(D3)



(D4)



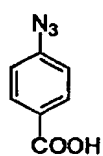
(D5)



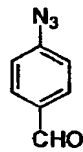
【0030】

【化3】

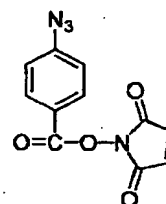
(D6)



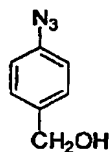
(D7)



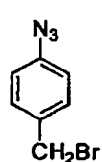
(D8)



(D9)



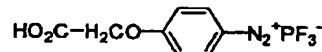
(D10)



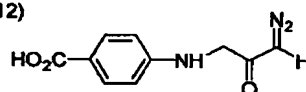
【0031】

【化4】

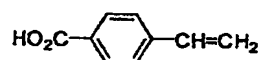
(D11)



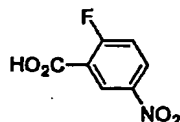
(D12)



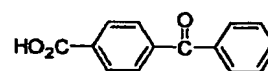
(D13)



(D14)

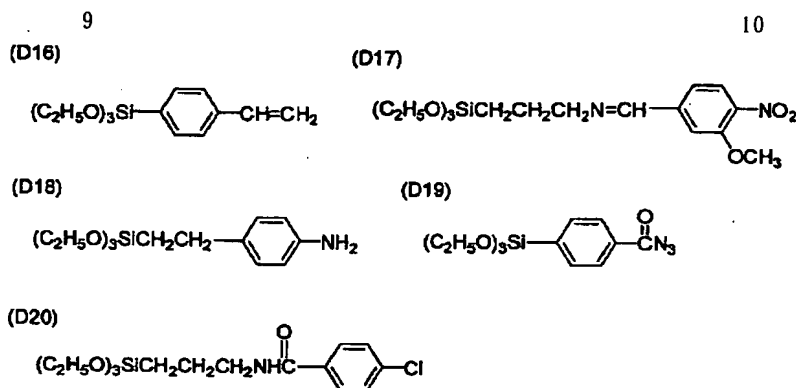


(D15)



【0032】

【化5】



【0033】固相担体としては、疎水性、あるいは親水性の低い担体であることが好ましい。また、その表面が凹凸を有する平面性の低いものであっても好ましく用いることができる。固相担体の材質としては、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックスもしくはニューセラミックス、ポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマー、シリコン、活性炭、多孔質ガラス、多孔質セラミックス、多孔質シリコン、多孔質活性炭、織物、編み物、不織布、濾紙、短繊維、メンブレンフィルター等の多孔質物質、金などの導電性材料などを挙げることができる。多孔質物質の細孔の大きさは、2乃至1000nmの範囲にあることが好ましく、2乃至500nmの範囲にあることが特に好ましい。固相担体の材質は、ガラスもしくはシリコンであることが特に好ましい。これは、表面処理の容易さや電気化学的方法による解析の容易さによるものである。固相担体の厚さは、100乃至2000 $\mu\text{m}$ の範囲にあることが好ましい。

【0034】固相担体は、その表面がポリ陽イオンなどのポリマーなどで被覆処理、あるいは固相担体表面への導入置換基を有するシランカップリング剤によって処理されている。あるいはプラズマ処理により表面に反応性官能基が導入されている。ポリ陽イオンによる場合には、アニオン種を静電結合によって固相担体表面に不完全ながら保持する事ができるが、シランカップリング剤による場合には、共有結合によって種々の化合物を固相担体表面に安定に結合させることができる点で好ましい。こうしてアミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシ基などを導入することができる。これらの導入基に共有結合を介して、光反応性基を有する化合物を連結してもよい。シランカップリング剤の例としては、 $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン、N- $\beta$ -(アミノエチル)- $\gamma$ -アミノプロピルトリメトキシシランあるいはN- $\beta$ -(アミノエチル)- $\beta$ -アミノプロピルメチルジメトキシシランを用いることが好ましく、 $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシランを用いることが特に好ましい。

【0035】ポリ陽イオンを用いる処理に、シランカッ

プリング剤による処理を組み合わせてもよい。疎水性、あるいは親水性の低い固相担体とDNA断片との静電的相互作用を促進することができる。表面処理がされた固相担体表面上に、さらに、電荷を有する親水性高分子等からなる層や架橋剤からなる層を設けてもよい。このような溝を設けることによって表面処理がきれた固相担体の凹凸を軽減することができる。固相担体の種類によっては、その担体中に親水性高分子等を含ませることも可能であり、このような処理を施した固相担体も好ましく用いることができる。

【0036】DNA断片は、目的によって二通りに分けることができる。遺伝子の発現を調べるためには、cDNA、cDNAの一部、EST等のポリヌクレオチドを使用することが好ましい。これらのポリヌクレオチドは、その機能が未知であってもよいが、一般的にはデータベースに登録された配列を基にしてcDNAのライブラリー、ゲノムのライブラリーあるいは全ゲノムをテンプレートとしてPCR法によって増幅して調製する（以下、「PCR産物」という。）。PCR法によって増幅しないものも好ましく使用することができる。また、遺伝子の変異や多型を調べるには、標準となる既知の配列をもとにして、変異や多型に対応する種々のオリゴヌクレオチドを合成し、これを使用することが好ましい。さらに、塩基配列分析の場合には、4<sup>n</sup>（nは、塩基の長さ）種のオリゴヌクレオチドを合成したものをを使用することが好ましい。DNA断片の塩基配列は、一般的な塩基配列決定法によって予めその配列が決定されていることが好ましい。DNA断片は、2乃至50量体であることが好ましく、10乃至25量体であることが特に好ましい。

【0037】DNA断片には、固相担体表面の導入置換基と結合を形成するための基を一方の末端に直接もしくは連結器を介して導入してもよい。これらの基の例としては、ヒドロキシ基、アミノ基など通常のDNA分子上に存在する基のほか、鎖状もしくは環状のアルケニル基（例えば、ビニル基、アリル基、シクロペンタジエニル基）、アルキニル基（例えば、フェニルエチニル基、アルコキシカルボニルエチニル基）、ヘテロ環基（例えば、フラン環、ピロール環、ベンゾフラン環、イソベン

ゾフラン環、インドール環)などが挙げられる。

【0038】DNA断片の点着は、DNA断片を水性媒体に溶解あるいは分散した水性液を、96穴もしくは384穴プラスチックプレートに分注し、分注した水性液をスポッター装置等を用いて固相担体表面上に滴下して行うことが好ましい。

【0039】点着後のDNA断片の乾燥を防ぐために、DNA断片が溶解あるいは分散してなる水性液中に、高沸点の物質を添加してもよい。高沸点の物質としては、DNA断片が溶解あるいは分散してなる水性液に溶解し得るものであって、試料核酸断片とのハイブリダイゼーションを妨げることがなく、かつ粘性の大きくない物質であることが好ましい。このような物質としては、グリセリン、エチレングリコール、ジメチルスルホキシドおよび低分子の親水性ポリマーを挙げることができる。親水性ポリマーとしては、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、ポリアクリル酸ナトリウム等を挙げることができる。ポリマーの分子量は $10^3$ 乃至 $10^4$ の範囲にあることが好ましい。高沸点の物質としては、グリセリンあるいはエチレングリコールを用いることがさらに好ましく、グリセリンを用いることが特に好ましい。高沸点の物質の濃度は、DNA断片の水性液中、0.1乃至2容量%の範囲にあることが好ましく、0.5乃至1容量%の範囲にあることが特に好ましい。また、同じ目的のために、DNA断片を点着した後の固相担体を、90%以上の湿度および25乃至50℃の温度範囲の環境に置くことも好ましい。

【0040】DNA断片を点着後、DNAとの間に共有結合を形成し得る活性種を発生させるための光照射を行う。照射する光の波長は活性種を発生させる光反応性化合物を直接または増感剤を介して間接的に励起させる波長であればよく、200乃至400nmの波長の範囲、特に254nm付近と360nm付近とが一般的である。光源は太陽光、水銀灯などの電灯光、レーザー光（半導体レーザー、固体レーザー、ガスレーザー）、発光ダイオードの発光、エレクトロルミネッセント素子の発光などが利用できる。光照射の方法は、水銀灯などの光源からの光を必要に応じて適当なフィルターを介して固相担体表面に均一に照射することもできるし、いわゆるマスクを用いて所望の形状のパターン露光をしてもよい。または、光をレンズや鏡を用いて集光し、微細な形状に照射してもよい。または、集光した光線を走査露光してもよい。次いで、固定化されなかったDNA断片を洗い流すことにより、固相担体表面に任意の形状にDNA断片を固定することができる。

【0041】DNA断片を点着後、DNAとの間に共有結合を形成し得る活性種を発生させるための光照射のほか、紫外線処理等の放射線処理、水素化ホウ素ナトリウムあるいはシッフ試薬による後処理を施してもよい。これらの後処理は、複数の種類を組み合わせても

よく、加熱処理と紫外線処理を組み合わせる行うことが特に好ましい。これらの後処理は、ポリ陽イオンのみによって固相担体表面を処理した場合には特に有効である。点着後は、インキュベーションを行うことも好ましい。インキュベート後、未点着のDNA断片を洗浄して除去することが好ましい。

【0042】DNA断片は、固相担体表面に対して、 $10^1$ 乃至 $10^5$ 種類/cm<sup>2</sup>の範囲にあることが好ましい。DNA断片の量は、1乃至 $10^{15}$ モルの範囲にあり、重量としては数ng以下であることが好ましい。点着によって、DNA断片の水性液は、固相担体表面にドットの形状で固定される。ドットの形状は、ほとんど円形である。形状に変動がないことは、遺伝子発現の定量的解析や一塩基変異を解析するために重要である。ドット間の距離は、0乃至1.5mmの範囲にあることが好ましく、100乃至300μmの範囲にあることが特に好ましい。1つのドットの大きさは、直径が50乃至300μmの範囲にあることが好ましい。点着する量は、100pL乃至1μLの範囲にあることが好ましく、1乃至100nLの範囲にあることが特に好ましい。

【0043】上記の工程によって作製されたDNAチップの寿命は、cDNAが固定されてなるcDNAチップで数週間、オリゴDNAが固定されてなるオリゴDNAチップではさらに長期間である。これらのDNAチップは、遺伝子発現のモニタリング、塩基配列の決定、変異解析、多型解析等に利用される。検出原理は、後述する標識した試料核酸断片とのハイブリダイゼーションである。

【0044】標識方法としては、RI法と非RI法（蛍光法、ビオチン法、電気化学的方法、化学発光法等）とが知られているが、本発明では蛍光法を用いる。蛍光物質としては、核酸の塩基部分と結合できるものであれば何れも用いることができるが、シアニン色素（例えば、CyDye™シリーズのCy3、Cy5等）、ローダミン6G試薬、N-アセトキシ-N'-アセチルアミノフルオレン(AAF)あるいはAAIF(AAFのヨウ素誘導体)などを使用することができる。

【0045】なお、上記の標識を利用する以外にも、導電性基を持ち、形成されたハイブリッド構造体に取り込まれる性質を持つインターカレータを用いる電気化学的な検出方法を利用する方法も知られており、本発明のDNAチップは電気化学的な検出方法に利用することもできる。あるいは、蛍光発生基を持ち、形成されたハイブリッド構造体に取り込まれる性質を持つインターカレータを用いて、ハイブリッドの形成を蛍光法により検出方法を利用する方法も知られており、本発明のDNAチップはこの検出方法に利用することもできる。

【0046】試料核酸断片としては、その配列や機能が未知であるDNA断片試料あるいはRNA断片試料を用いることが好ましい。試料核酸断片は、遺伝子発現を調

べる目的では、真核生物の細胞や組織サンプルから単離することが好ましい。試料がゲノムならば、赤血球を除く任意の組織サンプルから単離することが好ましい。赤血球を除く任意の組織は、末梢血液リンパ球、皮膚、毛髪、精液等であることが好ましい。試料がmRNAならば、mRNAが発現される組織サンプルから抽出することが好ましい。mRNAは、逆転写反応により標識dNTP（「dNTP」は、塩基がアデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）もしくはチミン（T）であるデオキシリボヌクレオチドを意味する。）を取り込ませて標識cDNAとすることが好ましい。dNTPとしては、化学的な安定性のため、dCTPを用いることが好ましい。1回のハイブリダイゼーションに必要なmRNA量は、液量や標識方法によって異なるが、数 $\mu$ g以下であることが好ましい。尚、DNAチップ上のDNA断片がオリゴDNAである場合には、試料核酸断片は低分子化しておくことが望ましい。原核生物の細胞では、mRNAの選択的な抽出が困難なため、全RNAを標識することが好ましい。試料核酸断片は、遺伝子の変異や多型を調べる目的では、標識プライマーもしくは標識dNTPを含む反応系で標的領域のPCRを行って得ることが好ましい。

【0047】ハイブリダイゼーションは、96穴もしくは384穴プラスチックプレートに分注しておいた、標識した試料核酸断片が溶解あるいは分散してなる水性液を、上記で作製したDNAチップ上に点着することによって実施することが好ましい。点着の量は、1乃至100nLの範囲にあることが好ましい。ハイブリダイゼーションは、室温乃至70℃の温度範囲で、そして6乃至20時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の試料核酸断片を除去することが好ましい。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いることが好ましい。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等を用いることができるが、クエン酸緩衝液を用いることが特に好ましい。

【0048】DNAチップを用いるハイブリダイゼーションの特徴は、標識した試料核酸断片の使用量が非常に少ないことである。そのため、固相担体に固定するDNA断片の鎖長や標識した試料核酸断片の種類により、ハイブリダイゼーションの最適条件を設定する必要がある。遺伝子発現の解析には、低発現の遺伝子も十分に検出できるように、長時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。一塩基変異の検出には、短時間のハイブリダイゼーションを行うことが好ましい。また、互いに異なる蛍光物質によって標識した試料核酸断片を二種類用意し、これらを同時にハイブリダイゼーションに用いることにより、同一のDNAチップ上で発現量の比較や定量ができる特徴もある。

【0049】

【実施例】【実施例1】DNA断片固定スライドの作成及びDNA断片の固定量の測定

本発明の固定方法を、DNA断片の反応経路によって表すこととし、その反応経路を図2に示す。図中、Mは、スライドガラスを表す。

【0050】（1）ジアジリン環が導入されたスライド（B）の作成

2重量%アミノプロピルエトキシシラン（信越化学工業（株）製）のエタノール溶液に、スライドガラス（25mm×75mm）を10分間浸した後取り出し、エタノールで洗浄後、110℃で10分間乾燥して、シラン化合物被覆スライド（A）を作成した。次いで、このシラン化合物被覆スライド（A）を、3-（3-カルボキシフェニル）-3-トリフルオロメチルジアジリン（3g）の1-メチル-2-ピロリドン（50mL）溶液に1時間浸した後取り出し、アセトニトリルで洗浄し、1時間減圧下乾燥して、ジアジリン環が導入されたスライド（B）を得た。

【0051】（2）DNA断片の点着と蛍光強度の測定  
3'末端および5'末端がそれぞれアミノ基、蛍光標識試薬（FluoroLink Cy5dCTP、アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製）で修飾されたDNA断片（3'-CTAGTCTGTGAAGTGTCTGATC5'）を0.1M炭酸緩衝液（pH9.3）に分散してなる水性液（ $1 \times 10^{-4}$ M、1 $\mu$ L）を、上記（1）で得たスライド（B）に点着した。直ちに、点着後のスライドをガラスフィルターを介して250Wの高圧水銀灯にて約20cmの距離から2時間照射した。このスライドを0.1重量%SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）と2×SSC（2×SSC：SSCの原液を2倍に希釈した溶液、SSC：標準食塩クエン酸緩衝液）との混合溶液で2回、0.2×SSC水溶液で1回順次洗浄した。次いで、室温で乾燥させ、DNA断片が固定されたスライド（C1）を得た。このスライド（C1）表面の蛍光強度を蛍光スキャニング装置で測定したところ、2670であった。この値は下記の比較例に比べてきわめて大きく、本発明の固定化方法により、DNA断片が効率よくスライドガラスに固定されたことが分かる。

【0052】【比較例1】水銀灯による光照射をしない  
他は実施例1と同様にしてスライド（C2）を作成した。このスライド（C2）表面の蛍光強度を蛍光スキャニング装置で測定したところ、164であった。すなわちDNA断片の固定量は実施例1に比べて遙かに少ないことがわかる。

【0053】【実施例2】試料DNA断片の検出  
（1）DNAチップの作成  
3'末端が蛍光標識試薬で修飾されていないDNA断片を用いる以外は実施例1と同様にして、DNA断片が固定されたスライド（D2）を得た。

【0053】【実施例2】試料DNA断片の検出

（1）DNAチップの作成

3'末端が蛍光標識試薬で修飾されていないDNA断片を用いる以外は実施例1と同様にして、DNA断片が固定されたスライド（D2）を得た。



## (2) 試料DNA断片の検出

5'末端にCy5が結合した22merの試料オリゴヌクレオチド(GATCAGACACTTCACAGACTAG5')をハイブリダイゼーション用溶液(4×SSCおよび10重量%のSDSの混合溶液)(20μL)に分散させたものを、上記(1)で得たスライド(D2)に点着し、表面を顕微鏡用カバーガラスで保護した後、モイスチャンパー内にて60℃で20時間インキュベートした。次いで、このものを0.1重量%SDSと2×SSCとの混合溶液、0.1重量%SDSと0.2×SSCとの混合溶液、および0.2×SSC水溶液で順次洗浄した後、6000rpmで20秒間遠心し、室温で乾燥した。スライドガラス表面の蛍光強度を蛍光スキャン装置で測定したところ、1629であった。

【0054】本発明の固定化方法によって作成されたDNAチップを用いることによって、DNAチップに固定されているDNA断片と相補性を有する試料DNA断片を検出できることが分かる。

【0055】

【発明の効果】本発明の固定方法によって、固相担体表 20 M スライドガラス  
面にDNA断片を安定かつ迅速に固定することができ \*

\* する。特に、固相担体表面にジアジリン化合物ををシランカップリング剤を用いて導入した場合には、ジアジリン化合物の固相担体表面への結合も、DNA断片との結合も共に共有結合であるため、強固にDNA断片を固定することができる。DNA断片の安定な固定は、遺伝子解析等に有効に利用することができる高い検出限界を有するDNAチップの作製を可能にする。その一つの例として、本発明によって作製されたDNAチップを用いて、試料核酸断片とのハイブリダイゼーションを行うことにより、DNAチップに固定されているDNA断片に相補性を有する試料核酸断片を感度よく検出することができる。

【図面の簡単な説明】

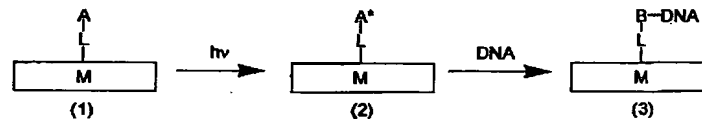
【図1】本発明の代表的な固定方法を示す模式図である。

【図2】本発明のDNA断片の固定方法(シランカップリング剤を用いる固相担体表面へのアミノ基の導入する工程を含む)を示す模式図である。

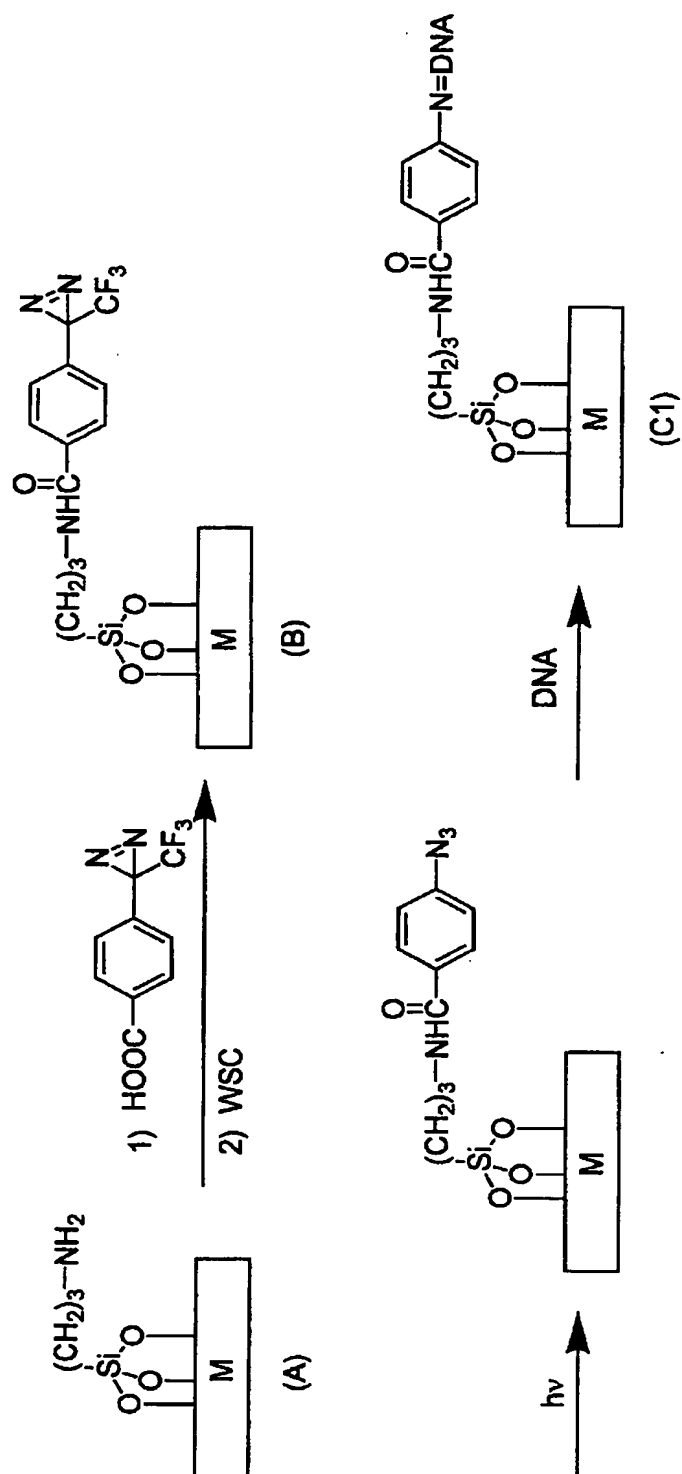
【符号の説明】

M スライドガラス

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 33/566

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 N 15/00

テ-マコ-ト (参考)

Z N A A

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA04 CA11 HA12  
HA19  
4B029 AA07 AA23 CC08 FA01 FA12  
FA15  
4B063 QA01 QQ42 QR32 QR56 QR58  
QR66 QR84 QS03 QS34 QS36  
QX02 QX05 QX07